

イネにおける生育齢依存的な病害抵抗性機構の解明 と病害抵抗性イネ作出への応用に関する研究

| | |
|--------|---|
| 著者 | 岩井 孝尚 |
| 号 | 44 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| 学位授与番号 | 農第729号 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/60146 |

氏 名(本籍) いわ い たか よし
岩 井 孝 尚

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 7 2 9 号

学位授与年月日 平 成 19 年 9 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 イネにおける生育齡依存的な病害抵抗性機構の解明と病
害抵抗性イネ作出への応用に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 西 尾 剛
(副 査) 教 授 池 上 正 人
 教 授 山 谷 知 行

論文内容要旨

遺伝子組換えによる実用的な病害抵抗性作物作出のために、現在、植物の病害抵抗性の分子機構に関する研究と、遺伝子発現時期や発現部位の特異性の高いプロモーターの開発が進められている。病害抵抗性機構に関する研究は、シロイヌナズナ等の双子葉植物を中心として研究が進められ、抵抗性発現には、サリチル酸、ジャスモン酸、エチレン等が内在二次シグナルとして重要であることが報告されている。しかしながら、病害抵抗性の本質である病原体の増殖抑制等については、未だに不明な点も数多く存在している。単子葉植物であるイネでは、いもち病や白葉枯れ病に対する抵抗性を中心に分子機構に関する研究が進められている。いもち病抵抗性のシグナル伝達は *Pseudomonas syringae* D20 の予備接種による全身誘導獲得抵抗性において研究が進められているが、過敏反応に伴ったサリチル酸やジャスモン酸の蓄積は認められておらず、関与する内在二次シグナルの特定にも至っていない。

本研究では、遺伝子組換えによる病害抵抗性イネ作出のための基礎技術を確立するために、イネの病害抵抗性機構の解析を行った。イネは生育齢の違いによって発生病害の種類や病害抵抗性程度に違いが見られることから、生育齢が病害抵抗性を発揮する為の重要な要因であると考えられる。そこで、抵抗性機構の解析では、異なった生育齢のイネを材料とした。育苗期間（鞘葉～第3葉期）では、発生が見られる苗立枯細菌病やもみ枯細菌病に対する抵抗性機構の解析を行うと共に、遺伝子組換えによる抵抗性系統の作出を試みた。本田移植後に発生が見られるイネのいもち病に対する抵抗性は、生育齢の若い時から過敏反応による抵抗性が発揮されるが、成長に伴った抵抗性の増強が観察される。葉身の維管束の分化程度等において違いが見られる4葉期イネと8葉期イネを用いていもち病抵抗性機構の解析を行い、いもち病抵抗性組換えイネ作出のための基礎的知見を得た。

第1章 育苗期間に発生する土壌伝染性病害に対する抵抗性機構の解析と抵抗性イネの作出

イネの育苗時に発生する苗立枯細菌病やもみ枯細菌病は、発芽後まもなく発病し、本葉2～3枚展開までに植物体が枯死する重要病害である。これら病害の発生要因の1つとして、田植機移植への変更に伴った好氣的な育苗環境への変化が考えられている。一方、昔から好氣的な畑地で栽培されているムギ類では、これら病害の発生が見られないことから、好氣的環境に適応した病害抵抗性機構を有していると考えられる。

オオムギの研究から、単子葉植物の発芽時に見られる鞘葉に、多種の抗菌性タンパク質が蓄積していることが報告されている。本研究では、その中で強い抗細菌活性が報告されているチオニンタンパク質に着目し、イネ及びエンバクの鞘葉で発現するチオニン遺伝子

の種類とゲノムにおける構成を比較した。イネでは、EST データベースから 1 種類のチオニン遺伝子 *Osthi1* を見いだした。エンバクでは、黄化幼苗の cDNA ライブラリーから 5 種類のチオニン遺伝子 (*Asthi1*~*5*) を単離した。これらの塩基配列から予測されるチオニンと既報のチオニンとを比較分類すると、チオニンは、1) 葉特異的チオニン (*Asthi1*~*3*)、2) 種子特異的チオニン、3) その他のグループ (*Asthi5*, *Osthi1*) の大きく 3 タイプに分類され (Figure 1), エンバクにはイネには存在しない分子種の葉特異的チオニン (*Asthi1*~*3*) が存在することが示された。チオニン遺伝子は、いずれの植物でも multigene family を形成し、イネでは *Osthi1* と極めて類似した約 10 コピーの遺伝子から構成され (Figure 2), エンバクでは、約 8 コピーの遺伝子から構成されていた (Figure 3)。 *Osthi1* と極めて類似のイネチオニン遺伝子 (Figure 2) 及び *Asthi1* と類似のエンバク葉特異的チオニン遺伝子 (Figure 3) は、いずれも鞘葉で恒常的に高発現し、葉身又は葉鞘においてジャスモン酸処理により発現誘導される遺伝子であった。その他のグループに属するチオニンはイネ及びエンバクの両方に存在したが、葉特異的チオニンはムギ類固有の分子種で鞘葉に発現が認められたことから、葉特異的チオニンがエンバクにおける苗立枯細菌病等に対する抵抗性に関わっていることが推測された。

35S プロモーター由来の高発現プロモーターを用いて *Asthi1* を高発現する *Asthi1* 導入イネの作出を行った。自殖と *Asthi1* の蓄積量による選抜により、1 コピーの *Asthi1* 遺伝子をホモに持ち (Figure 4), 高発現する自殖第 3 世代 (T₃) の 3 系統 (line 2, 77, 91) の種子を得た。*Asthi1* 蓄積量は、line 2 と 77 で約 100 ng / mgFW で、line 91 で約 70 ng / mgFW であり、*Asthi1* は細胞壁に局在すると考えられた (Figure 5)。

Asthi1 遺伝子導入イネの種子を用いて苗立枯細菌病及びもみ枯細菌病に対する抵抗性検定を行ったところ、*Asthi1* 導入イネは、いずれの病害に対しても強い抵抗性を示した (Figures 6 and 7A)。細菌の染色により、苗立枯細菌病の発病は、鞘葉表面の気孔部分 (Figure 7B の赤矢印) から組織内部へ苗立枯細菌が侵入し、細胞間隙で増殖したこと (Figure 7Bh の緑矢印) によって引き起こされたことが示され、*Asthi1* 導入イネ系統での抵抗性は、苗立枯細菌の鞘葉表面の気孔からの侵入抑制 (Figure 7B f 及び i の赤矢印) によることが分かった。

矢頭ら (2003) は、本 *Asthi1* 導入系統の実用化に向けて環境に対する安全性評価を実施し、隔離圃場において強い苗立枯細菌病及びもみ枯細菌病に対する抵抗性を確認した。しかし、非組換え体に比べ若干の草丈の減少や籾重の低下等の変異が見られた。そこで、戻し交雑後代を用いて、変異形質と *Asthi1* 蓄積量との関係を調べたところ、相関は認められず、これら変異形質は遺伝子導入時の培養変異に由来すると考えられた (Figure 8)。

第2章 幼若なイネにおけるいもち病抵抗性機構の解析

4葉期イネを用いて、いもち病抵抗性に関わるシグナルについて解析した。いもち病菌レース 003 の接種により罹病性を示すイネ品種「日本晴」とレース 003 に対する抵抗性遺伝子 *Pii* を持つ「日本晴」の準同質遺伝子系統 IL7 を植物材料とした。IL7 においては接種後 42 から 72 時間目に過敏感反応が見られ、「日本晴」では接種後 96 時間目から罹病型の進展型病斑が形成された (Figure 9A)。レース 003 接種後のイネにおいて、サリチル酸蓄積量、エチレン発生量、及びジャスモン酸蓄積量を経時的に測定して罹病性と抵抗性を比較したところ、過敏感反応に伴った一過的な発生がエチレンのみで認められた (Figure 9B)。植物のエチレン生合成反応を触媒する ACC 合成酵素 (ACS) と ACC 酸化酵素 (ACO) のいもち病菌感染葉における働きを調べると、ACS は抵抗性と罹病性の両反応における病斑形成に伴って活性化し、ACO は IL7 の過敏感反応に伴って活性化することが明らかとなった (Figure 10)。イネゲノムの塩基配列データベースを検索したところ、イネ ACS 及び ACO 遺伝子は、それぞれ 6 コピー及び 7 コピーの遺伝子からなる multigene family を形成していた (Figures 11 and 12)。RT-PCR を行うと、過敏感反応に伴った酵素の働きと対応した発現を示す *OsACS2* 及び *OsACO7* が明らかとなり、これら 2 遺伝子が抵抗性特異的なエチレン発生に寄与していると考えられた (Figure 13)。また、過敏感反応に伴ったエチレン発生のいもち病抵抗性反応における機能を調べるために、いもち病菌接種 24 時間後にエチレン合成阻害剤の AOA (Aminooxyacetic acid) を接種葉に処理すると、エチレンの発生抑制と共に抵抗性が打破された (Figure 14)。

以上の結果から、幼若な 4 葉期イネにおけるいもち病抵抗性には、エチレン生合成反応が必須であるが、サリチル酸の蓄積は関係しないことが明らかとなった。

第3章 イネの成長に伴ったいもち病抵抗性機構の変化の解析

4葉期イネを材料としたいもち病抵抗性の研究から、イネの過敏感反応に伴った抵抗性にはサリチル酸の蓄積誘導が伴わないことが明らかとなった。しかしながら、シロイヌナズナの研究から、いもち病防除剤として使われているプロベナゾール (農薬オリゼメートの原体) はサリチル酸の蓄積を誘導することで抵抗性を発揮することが明らかなことから、イネいもち病抵抗性におけるサリチル酸の機能とプロベナゾールの作用機作は不明であった。

本研究では、水田におけるプロベナゾールの施用が成熟した 8 葉期前後のイネに行われることに着目し、生育齢の異なったイネに対するプロベナゾールの効果を調べた。幼若な 4

葉期イネと成熟した 8 葉期イネを用いて、いもち病抵抗性遺伝子 *Pii* による抵抗性とプロベナゾール処理による誘導抵抗性の抵抗性程度を比較した。*Pii* による抵抗性では、いずれの生育齢でも過敏感反応の起こる時期に違いはなかったが、褐点型病斑の形成数及びその大きさにおいて、4 葉期イネでの抵抗性が弱い傾向が見られた。一方、罹病性個体のプロベナゾール処理の効果は、4 葉期イネと 8 葉期イネで顕著な違いが見られた。4 葉期イネでの効果は進展型病斑形成の遅延と病斑数の減少であったが、8 葉期イネにおいては過敏感反応によるほぼ完全な抵抗性が誘導された (Figure 15)。サリチル酸の蓄積量を調べると、8 葉期イネでのみ約 6 倍量のサリチル酸が誘導されていた (Figure 16)。サリチル酸処理による抵抗性誘導効果を調べると、8 葉期イネでのみ過敏感反応による抵抗性が誘導された (Figure 17)。これらのことから、8 葉期イネでは、プロベナゾール処理によってサリチル酸の蓄積が誘導され、その結果として過敏感反応による抵抗性が発現したと考えられた。一方、4 葉期イネは、サリチル酸蓄積誘導能とサリチル酸に対する感受性のいずれも不完全であるため、過敏感反応による抵抗性が誘導できなかったと考えられた。

まとめ

イネの発芽時の病害抵抗性は、鞘葉に蓄積する抗菌性タンパク質の種類と効果に依存していると考えられた。エンバク固有の葉特異的チオニン遺伝子 *Asthi1* のイネへの導入は、これまで抵抗性品種及び交雑可能な抵抗性遺伝資源が報告されていない苗立枯細菌病及びもみ枯細菌病に対する新たな抵抗性付与技術として有効と考えられた。

いもち病抵抗性遺伝子 *Pii* による抵抗性の分子機構には、過敏感反応に伴ったエチレン生合成反応が必須であることが明らかとなった。更に、成長に伴ったサリチル酸蓄積能力とサリチル酸に対する感受性の獲得によって、生育齢の進んだイネはより高度な抵抗性を獲得していると考えられた。これらのことから、いもち病菌レースに影響されない抵抗性イネを作出するためには、病斑部においてエチレン生合成反応が誘導されることが必須であり、罹病型病斑形成においても *OsACO7* 等の *ACO* 遺伝子を発現させる仕組みを構築することが重要であると考えられる。今後、いもち病菌感染によって病斑部で発現誘導するプロモーター等の取得により、エチレン生合成を病斑部で誘導することでいもち病抵抗性を発揮する組換えイネの実現を目指したいと考えている。

| Type | Gene | Plant | Mature thionin region | | | | | | | | | | AAs | pI |
|--------|----------|--------|-----------------------|----|----|----|----|------|----|----|----|----|-----|------|
| Leaf | Asthi1 | Oat | KS | 21 | 38 | 46 | 46 | 9.13 | | | | | | |
| | Asthi2 | Oat | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 46 | 9.13 |
| | Asthi3 | Oat | NT | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 46 | 8.04 |
| | BTH6 | Barley | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 46 | 8.88 |
| | DB4 | Barley | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 46 | 8.88 |
| Seed | DG3 | Barley | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 46 | 8.89 |
| | alpha1 P | Wheat | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 45 | 9.87 |
| | alpha2 P | Wheat | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 45 | 9.87 |
| | alpha H | Barley | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 45 | 9.87 |
| | AVTA | Oat | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 45 | 9.52 |
| Others | Asthi4 | Oat | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 46 | 8.26 |
| | Asthi5 | Oat | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 45 | 8.46 |
| | Osthi1 | Rice | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 45 | 8.77 |
| | thi2.1 | Arb. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 43 | 9.61 |
| | thi2.2 | Arb. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 46 | 8.49 |

Figure 1. Characteristics of oat leaf-specific thionins.

Comparison of the mature thionin domain of representative plant thionins. Leaf-type (shown in green), seed-type (orange) and other thionins were classified using the NJ method (Saitou et al. 1987) by GENETIX 9.0 (Software Development Co., Tokyo, Japan). Conserved cysteine residues are shaded in lighter purple. The conserved 13th tyrosine residue is marked with an asterisk. The sequences are from BTH6 (Holtorf et al. 1995), DB4 and DG3 (Bohlmann et al. 1987), 1- and 2-purothionin (Mak et al. 1976), alpha hordothionin (Rodriguez et al. 1988), and thi2.1 and thi2.2 (Epple et al. 1995). The sequences of Asthi1-5 (genebank accession number; AB072338-AB072342) and Osthi1 (AB072337) are from the present study. AAs means the number of amino acids. The calculated isoelectric point is given on the right. Alignments were carried out by the GENETIX 9.0 program.

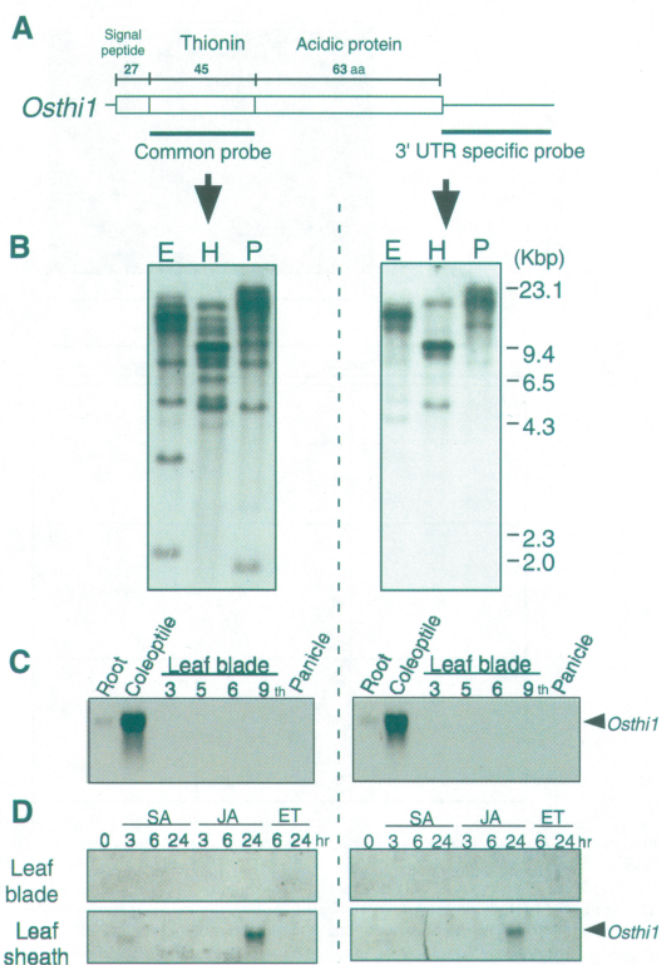


Figure 2. Characterization of the rice thionin gene.

(A) The *Osthi1* gene encodes three conserved domains for plant thionins. (B) Southern blot analysis was performed using genomic DNA (5 µg) from *Oryza sativa* cv. Nipponbare after digestion with *EcoR* I (E), *Hind* III (H) and *Pst* I (P), using a common probe corresponding to the mature thionin domain (left panel) and a specific probe corresponding to the 3'UTR (right panel). (C) Total RNA (20 µg) was subjected to Northern blot analysis using the common probe under low stringency conditions (two washes with 1 x SSC and 0.1% SDS at 60 °C for 20 min, left panel) and the specific probe under high stringency conditions (two washes with 0.1 x SSC and 0.1% SDS at 68 °C for 20 min, right panel). Root; from 2-week-old rice plants, Coleoptile; from 4-day-old etiolated plants, Leaf blade; from a fully expanded leaf of the plant at each leaf stage, Panicle; from 2-month-old plants. (D) Total RNA (20 µg) was subjected to Northern blot analysis as shown in Fig. 1-2C. Leaf blades and sheaths from the plant at 3.5 leaf stage were treated for 24 hr with 3 mM salicylic acid (SA), 1 mM jasmonic acid (JA) and 1 mM ethephon (ET).

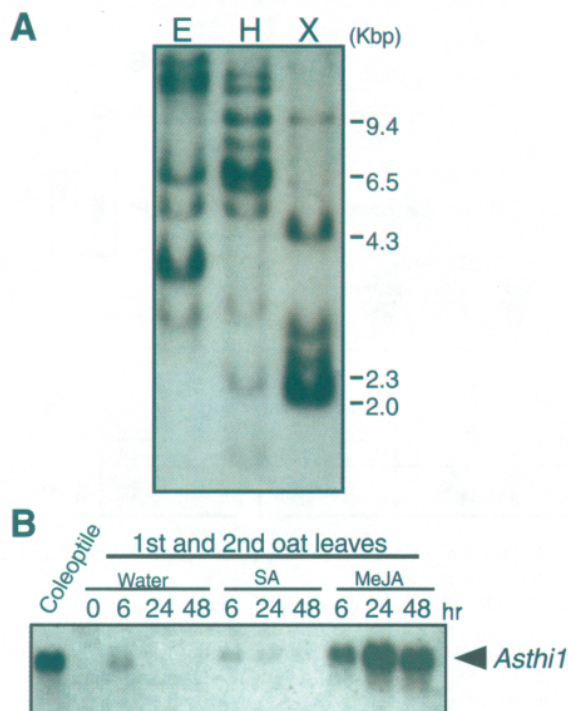


Figure 3. Characterization of oat leaf-specific thionin genes. (A) Digested genomic DNA (5 µg) from *Avena sativa* cv. Zensin was subjected to Southern blot analysis using the mature thionin domain of *Asthi1* as a probe. (B) Poly(A) RNA (2 µg) was subjected to Northern blot analysis. Coleoptiles were prepared from 5-day-old etiolated oat seedlings. First and second leaves treated with water, 50 µM SA and 50 µM MeJA for the indicated time period were prepared from 10-day-old oat seedlings.

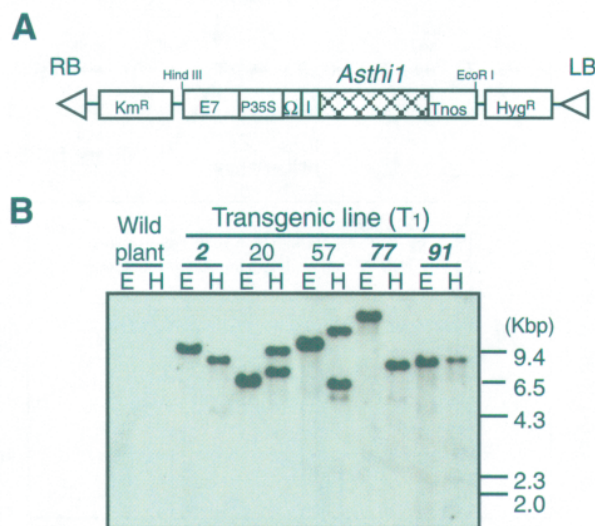


Figure 4. Production of transgenic rice plants overproducing *Asthi1*. (A) Construct of the introduced gene. (B) Southern blot analysis of the *Asthi1* gene in transgenic rice lines. Digested genomic DNA (5 µg) was hybridized with the thionin domain of *Asthi1* as a probe.

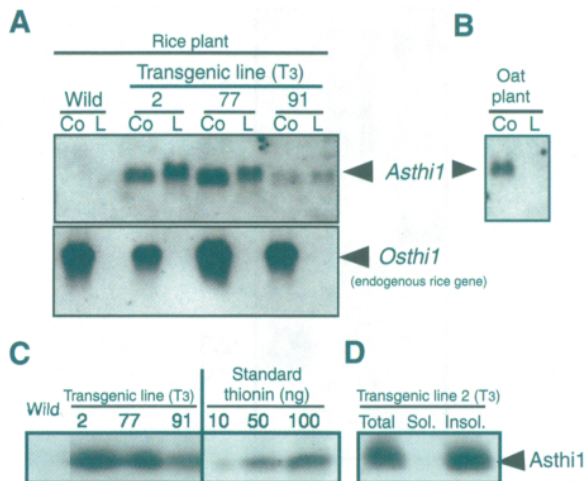


Figure 5. Expressions of *Asthi1* and accumulations of the introduced gene product in transgenic rice plants

(A) Total RNA (20 µg) from the coleoptile (Co) and leaf blade (L) of transgenic rice lines 2, 77 and 91 (T3) was subjected to Northern blot analysis using the thionin region of *Asthi1* as a probe under high stringency conditions (two washes with 0.1 x SSC and 0.1% SDS at 68 °C for 20 min, upper panel) and the common probe of *Osth1* under low stringency conditions as shown in the legend of Fig. 2C (lower panel). (B) Levels of *Asthi1* expression in the coleoptiles of 5-day-old wild-type oat seedlings. (C) Accumulation of *Asthi1* protein in the coleoptiles of 5-day-old transgenic rice lines 2, 77 and 91. Synthetic *Asthi1* was used as the standard. Polyclonal antibody against synthetic *Asthi1* was prepared in rabbits and used as primary antibody. Crude protein extract corresponding to 1 mg FW of coleoptiles from transgenic lines was used in each lane. (D) Localization of expressed *Asthi1* protein. Coleoptiles from one-week-old transgenic line 2 were homogenized and fractionated to soluble (sol.) and insoluble (insol.). Insoluble fraction mainly included cell walls. An aliquot corresponding to 1 mg FW of coleoptiles was subjected to Western blot analysis.

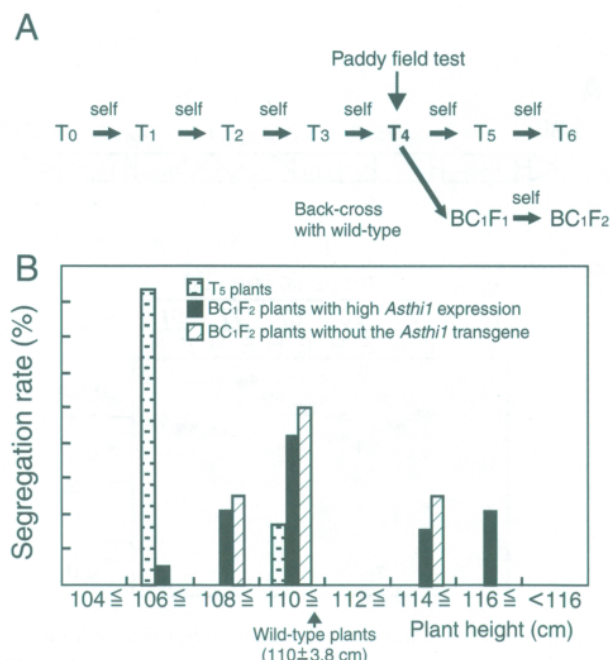


Figure 8. Segregation on plant height of transgenic plants overproducing *Asthi1*. (A) Pedigree of transgenic plants back-crossed with wild-type plants (BC₁F₂). (B) Segregation rate on plant height of T₅ plants, BC₁F₂ plants with high *Asthi1* expression and BC₁F₂ plants without the *Asthi1* transgene.

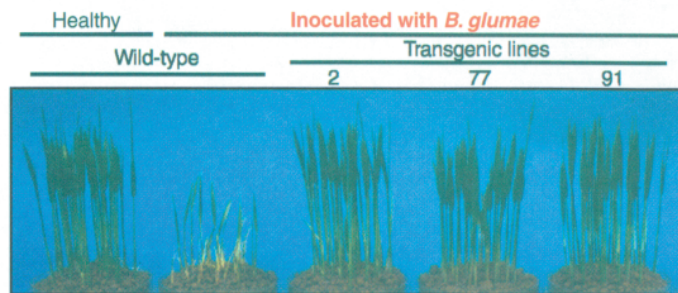


Figure 6. Phenotype of transgenic rice lines at 10 days after inoculation of *Burkholderia glumae*. Wild-type and transgenic rice seeds (T3) were soaked in a suspension of *B. glumae* (10⁶ colony forming units (cfu) / ml) and sowed in sterilized soil.

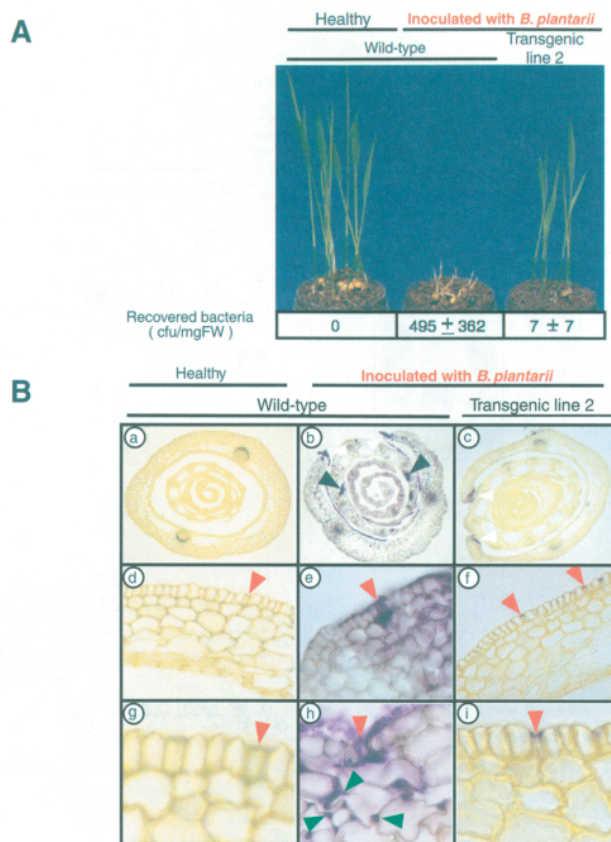


Figure 7. Enhanced resistance to infection by necrotrophic bacteria in transgenic rice lines overproducing *Asthi1*.

(A) Phenotype of transgenic line 2 ten days after inoculation of *Burkholderia plantarii*. The number of bacteria recovered from infected seedlings is shown at the bottom of the picture; crude extract of inoculated seedlings was spread on agar medium containing 50 µg/ml of tropolone (Sigma, Missouri, USA) which is the toxin produced by *B. plantarii*, and colonies were enumerated 2 days after incubation at 27 °C.

(B) Microscopical observation of *B. plantarii* in cross sections (15 µm thick) of the inoculated rice seedlings. (a), (d) and (g), the coleoptiles in healthy wild-type seedlings. (b), (e) and (h), wild-type coleoptiles inoculated with 1 x 10⁶ cfu/ml. (c), (f) and (i), the coleoptiles from inoculated transgenic line 2. Black arrowheads show the aerenchyma. Red arrowheads show the immature stomata on the surface of coleoptiles. Green arrowheads show bacteria accumulated in the intercellular spaces. White arrowheads show the non-specific absorption of the bacteria at the cut sites which developed with coleoptile splits at the growth stage. All sections were stained by Stoughton's double staining method (Stoughton et al. 1930).

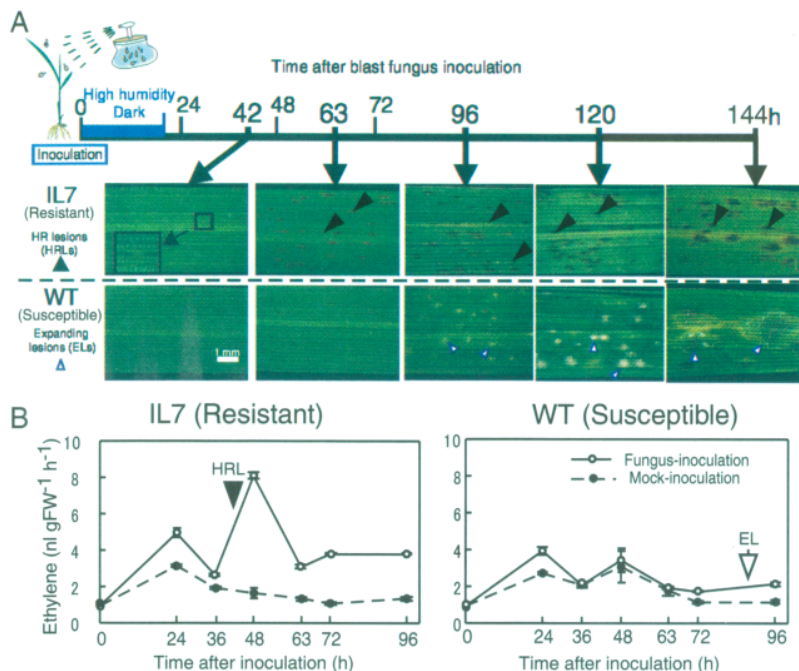


Figure 9. Development of lesions in young rice leaves inoculated with blast fungus. (A) Photographs of blast fungus-inoculated 4th leaves of IL7 and wild-type (WT) plants at the 4-leaf stage. A conidial suspension of blast fungus race 003 was sprayed on a resistant cultivar IL7 (upper panels), which contains the resistance gene *Pii* against blast fungus race 003 in the Nipponbare background, and on WT Nipponbare, which is a susceptible cultivar (lower panels). In inoculated IL7 leaves, HR lesions (HRLs; closed arrowhead) appeared at 42 hpi and matured by 63 hpi turning dark brown. In inoculated WT leaves, whitish expanding lesions (ELs; open arrowhead) were found at 96 hpi. The bar indicates 1 mm. (B) Profiles of ethylene (ET) emission from young rice leaves inoculated with blast fungus. ET emission in resistant IL7 leaves and susceptible WT leaves was determined using sixteen 4th leaves at the 4-leaf stage for one sample. Solid lines show the level of ET emission after fungus-inoculation. Broken lines show the level after mock-inoculation.

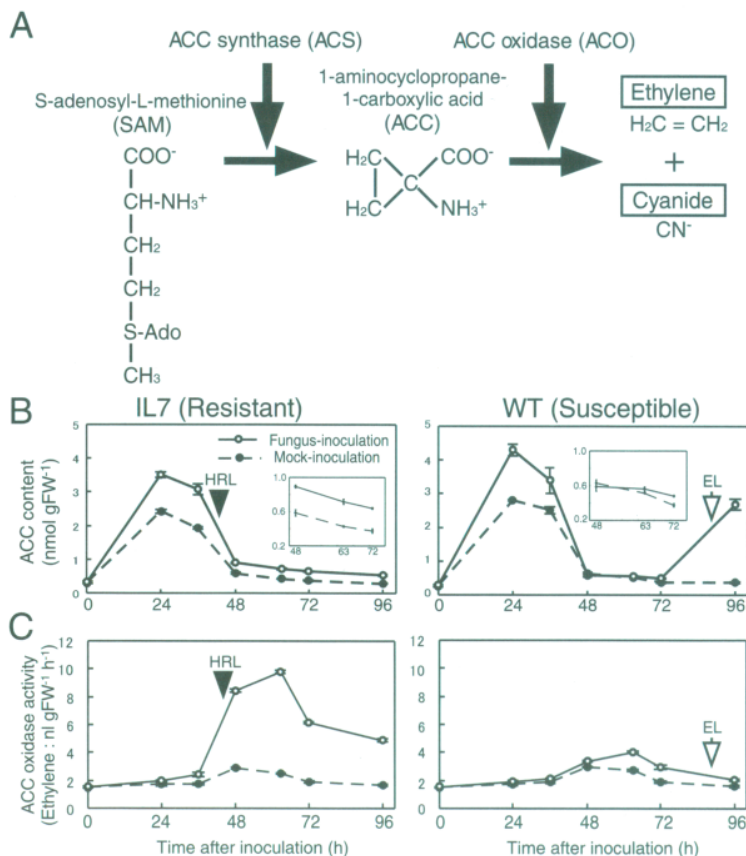


Figure 10. Profiles of ACC accumulation and ACO activity in young rice leaves inoculated with blast fungus. (A) Pathway of ET biosynthesis in plants. Conversion of S-adenosyl-L-methionine to the cyclic amino acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), was catalyzed by ACC synthase, and the subsequent oxidation of this intermediate to ethylene and cyanide was catalyzed by ACC oxidase. (B) ACC content in resistant IL7 leaves and susceptible WT leaves determined using twenty-four 4th leaves at the 4-leaf stage for one sample. Solid lines show the level of ET emission after fungus-inoculation. Broken lines show the level after mock-inoculation. Inoculated leaves were homogenized and ACC in the extract was chemically converted to ET. An expansion at 48 to 72 hpi is shown in a frame. (C) ACO activity determined as the capacity for converting ACC to ET using twelve 4th leaves at the 4-leaf stage for one sample. Values in A, B and C are shown as the means \pm SD based on three independent experiments. The experiment was repeated twice with similar results. The symbols without visible error bars indicate that bars are present inside the symbols.

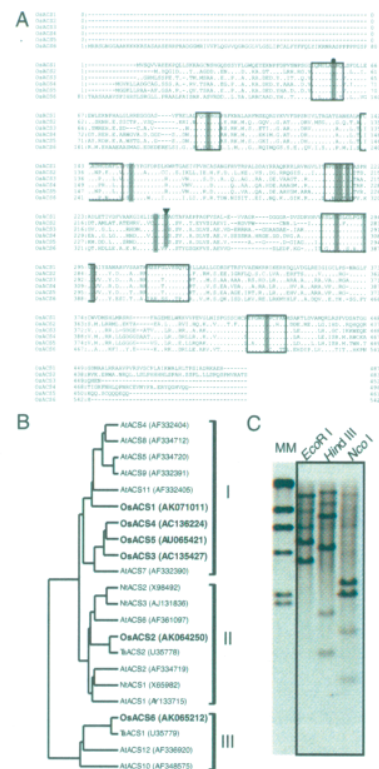


Figure 11. Characterization of the ACS gene family in rice plants. (A) Amino acid sequence alignment of six putative ACS polypeptides from rice. Shading indicates the eleven invariant amino acids conserved among ACS isozymes and various aminotransferases. The conserved glutamine residue (E) marked with the filled circle is involved in substrate specificity. The seven conserved domains of the ACS isozymes are marked as boxes. (B) Phylogenetic analysis of the putative amino acid sequences of ACS genes from rice (Os), Arabidopsis (At), tobacco (Nt) and wheat (Ta) using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (Sokal et al., 1958) using GENETIX (GENETYX Co., Tokyo, Japan). They were classified into three groups (I, II and III). GeneBank accession numbers of the sequences are given in parentheses. (C) Genomic Southern blot analysis of rice ACS genes using a common probe for the three rice ACS genes. Five micrograms each of rice genomic DNA was digested with *EcoRI* (E), *HindIII* (H) and *NcoI* (N), respectively, and applied to each lane. The left lane contains the markers for molecular weights.

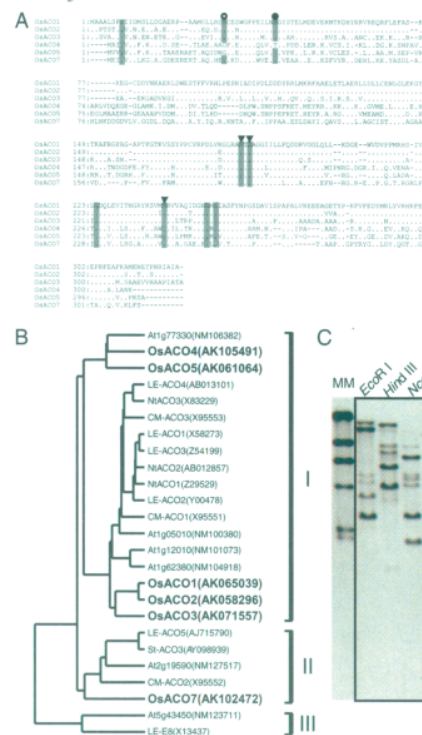


Figure 12. Characterization of the ACO gene family in rice plants. (A) Amino acid sequence alignment of six putative ACO polypeptides except OsACO6 which is encoded by a pseudogene. Nine shaded amino acid residues were conserved in members of the Fe (II) ascorbate family of dioxygenases (Lasserre et al., 1996). Three conserved amino acid residues found in ACOs from other plant species for the binding of iron (II), namely histidine (H) at 183, aspartic acid (D) at 185 and H at 240, are with arrowhead. Amino acid residues with open or closed circles were not conserved in OsACO4 or OsACO5. (B) Phylogenetic analysis of the putative ACO proteins from rice (Os), Arabidopsis (At), tomato (Le) and tobacco (Nt) using the UPGMA using GENETIX. The proteins were classified into three groups. GeneBank accession numbers of the sequences are given in parentheses. (C) Genomic Southern blot analysis using a common probe derived from the six rice ACO genes. Five micrograms each of rice genomic DNA was digested with *EcoRI* (E), *HindIII* (H) and *NcoI* (N), respectively, and applied to each lane. The left lane contains the markers for molecular weight.

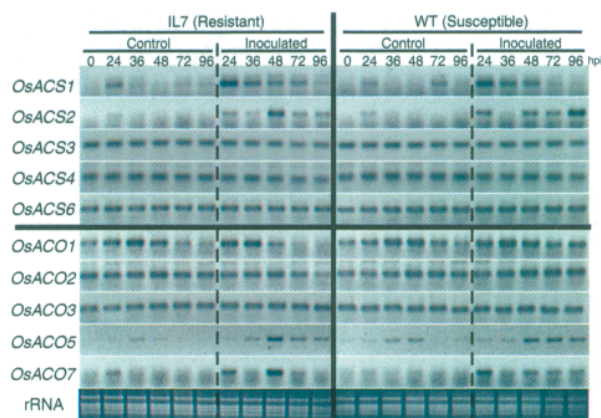


Figure 13. Expression profiles of rice *ACS* and *ACO* genes by one-step RT-PCR using 0.5 μ g of total RNA prepared from mock- and fungus-inoculated rice leaves at indicated time points. The specific primers for each *OsACS* and *OsACO* gene were used for the amplification of transcripts.

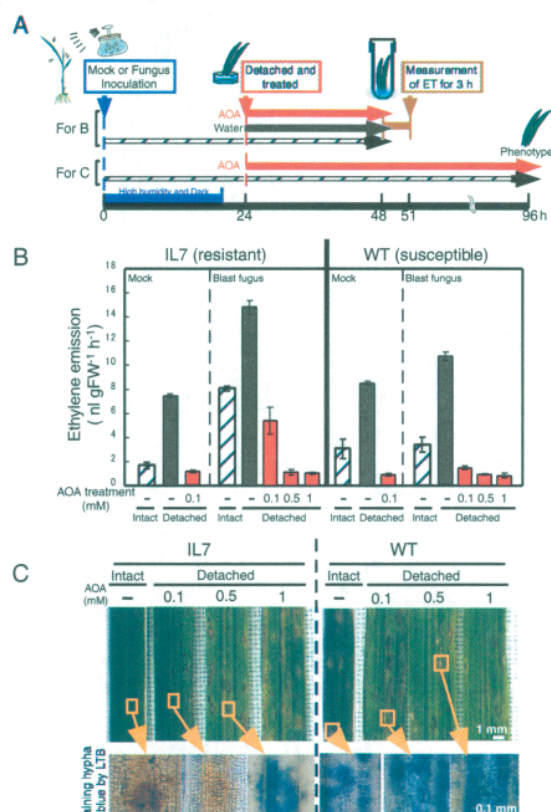


Figure 14. Suppressed ET emission accompanied by breakdown of the resistance to blast fungus-infection in AOA-treated rice plants. (A) Illustrated procedure of the experiments with AOA. An AOA solution (0.1, 0.5 or 1 mM) or water (control) was supplied from the cut base of the freshly detached leaf at 24 hpi and incubated for a further 24 h to determine the level of ET emission (for B), or for a further 72 h to observe the phenotype of treated leaves (for C). The leaves were transferred into a sealed vial at 48 hpi, and the ET emitted from these leaves was determined after 3 h. Sixteen leaves from 16 individual plants at the 4-leaf stage were used for one sample. For observation of lesion phenotypes in treated leaves, leaf sections of IL7 and WT were treated with lactophenol-trypan blue (LTB) at 96 hpi for staining fungal mycelium in blue. (B) Levels of ET emission after AOA treatment. The levels of ET emission are shown as the mean \pm SD based on three independent experiments. (C) Phenotypes of AOA-treated and fungus-inoculated rice leaves at 96 hpi. Non-detached control leaves are shown at the left.

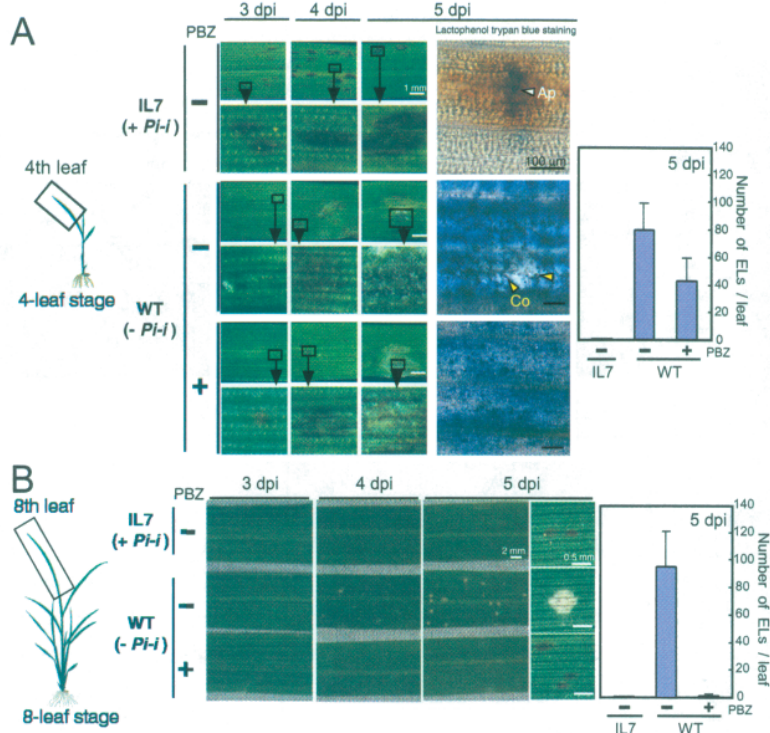
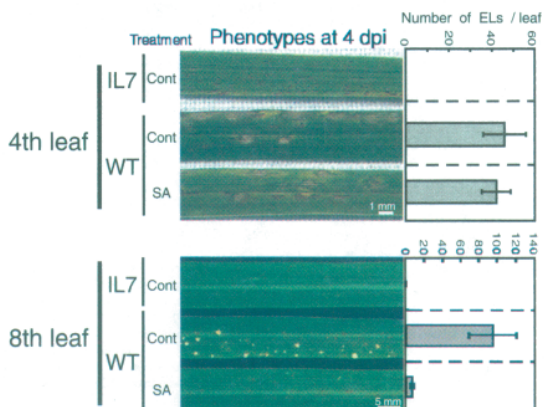


Figure 15. Phenotypes of blast fungus-inoculated leaves of young and mature rice plants. (A) Blast fungus-inoculated 4th leaves of IL7, wild-type (WT) plants and PBZ-pretreated WT plants at the 4-leaf stage. PBZ was sprayed to young plants 2 days prior to blast fungus inoculation. A conidial suspension of blast fungus race 003 was sprayed on incompatible cultivar IL7 (upper panels), which contains the resistance gene *Pii* against blast fungus race 003 in the Nipponbare background, and on WT Nipponbare, a compatible cultivar (lower panels). HRLs appeared by 3 dpi on inoculated IL7 leaves. ELs were clearly found at 4 dpi on inoculated WT leaves and at 5 dpi on PBZ-pretreated leaves. The bar indicates 1 mm. Hyphae and conidia in inoculated leaves at 5 dpi were stained blue with lactophenol-trypan blue. The bar indicates 100 μ m. Brownish appressoria (Ap; open arrow head) were observed in the center of HR lesions. Conidia (Co; yellow arrow head) were visible on ELs at 5 dpi in susceptible WT plants. ELs were counted at 5 dpi for evaluation of resistance. (B) Blast fungus-inoculated 8th leaves of IL7, WT and PBZ-pretreated plants at the 8-leaf stage. PBZ was sprayed to adult plants 2 days prior to blast fungus inoculation. Inoculated IL7 and WT 8th leaves at the 8-leaf stage were similar to 4th leaves at the 4-leaf stage. However, small HR-like lesions were found at 3 dpi in PBZ-pretreated WT leaves, like IL7 leaves at the 8-leaf stage.

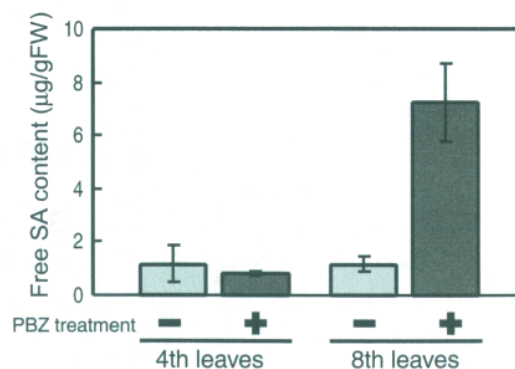


Figure 16. Free SA levels in rice leaves after PBZ treatment. Free SA accumulated in young and adult leaves 2 days after PBZ treatment. A pooled sample containing three leaves (1.0 g) of the 8th leaf at the 8-leaf stage was used for quantification of free SA. The values were the means \pm SD from three independently-prepared samples. Increased accumulation of free SA was induced only in adult PBZ-treated plants. The experiment was repeated twice with similar results.

Figure 17. Induced resistance to blast fungus by SA-treatment. A 3mM SA solution was sprayed onto rice leaves one day before blast fungus inoculation. A conidial suspension was sprayed onto rice plants at the 4th leaf stage at 1.0×10^5 conidia / ml (upper panel) and 8th leaf stage at 3.0×10^5 conidia / ml (lower panel). ELs were counted at 5 dpi for evaluation of the level of resistance. There was no clear difference in the formation of susceptible ELs observed between water-treated and SA-treated 4th leaves at the 4-leaf stage. Small HRLs were induced by SA treatment after blast fungus inoculation on 8th leaves at the 8-leaf stage of WT plants, like that in *Pii*-mediated resistance (IL7), resulting in a decrease of ELs.

論文審査結果要旨

病害抵抗性の発現にはサリチル酸やジャスモン酸，エチレン等が内在二次シグナルとして重要であることが分かっているが，イネにおいては過敏感反応に伴ったサリチル酸やジャスモン酸の蓄積は認められておらず，内在二次シグナルの特定がなされていない。本研究は，イネの生育齢で異なる病害抵抗性機構の解析を行うとともに，その知見を元に病害抵抗性イネの作出技術を開発しようとしたものである。

イネの育苗期間には，田植機の普及に伴う好気的な育苗環境への変化により，苗立ち枯れ細菌病やもみ枯細菌病が多発するようになった。好気的な畑地で栽培されるムギ類はこれら病害に対する抵抗性機構を有していると考えられる。イネとエンバクの発芽時の鞘葉で蓄積する抗菌性タンパク質のチオニンを比較し，エンバクではイネには見られない特性のチオニンの遺伝子があることを見出した。その遺伝子 *Asthi1* を高発現プロモーターにつないでイネに導入し，形質転換体を作成した。*Asthi1* を高発現する形質転換体の自殖種子を用いて苗立ち枯れ細菌病及びもみ枯細菌病に対する抵抗性を検定し，形質転換体は両病害に対して強い抵抗性を示すことを示した。

4葉期のイネを用いて，いもち病抵抗性と罹病性の品種におけるいもち病菌接種後のサリチル酸，エチレン，ジャスモン酸の蓄積量を測定し，エチレンのみ過敏感反応に伴って発生することを見出した。エチレン合成には ACC 合成酵素（ACS）と ACC 酸化酵素（ACO）が働いているが，ACO が抵抗性品種の過敏感反応に伴って活性化することを明らかにした。また，エチレン合成阻害剤の処理で抵抗性が打破されることを見出した。これらのことから，4葉期のイネのいもち病抵抗性にはエチレン生合成反応が必須であり，サリチル酸蓄積は関与しないことを示した。

4葉期のイネではサリチル酸蓄積は抵抗性に関与しないことを示したが，いもち病防除剤のプロベナゾールは，サリチル酸蓄積を誘導することで抵抗性を発揮することが知られている。4葉期と8葉期の罹病性品種を用いてプロベナゾールの効果を比較した結果，8葉期では過敏感反応による完全な抵抗性が誘導されるものの，4葉期では効果が不十分であった。8葉期イネではプロベナゾール処理によりサリチル酸蓄積が誘導されたが，4葉期ではサリチル酸蓄積もサリチル酸に対する感受性も不完全であることを明らかにした。

以上のように本研究は，イネの生育齢によっていもち病に対する抵抗性反応が大きく異なることを明確に示し，遺伝子組換え技術により新たな病害抵抗性を付与できることを明らかにしたもので，研究の農学上の貢献は大きい。よって，審査員一同は本論文は博士（農学）の学位を授与するに値する内容であると判定した。